

3'-Methyl-4-Dimethylaminoazobenzene によって誘発した ラット肝癌の Butyrylcholinesterase 活性についての 組織化学的および細胞化学的研究

横山 繁昭 金子 愛子 伝法 公磨
千坂 礼靖 森 道夫

札幌医科大学病理学第2講座 (指導 小野江為則)

Histochemical and Cytochemical Studies on the Butyrylcholinesterase Activity of Rat Hepatoma induced by 3'-Methyl- 4-Dimethylaminoazobenzene

Shigeaki YOKOYAMA, Aiko KANEKO, Kimimaro DEMPO,
Noriyasu CHISAKA and Michio MORI

Department of Pathology (Section 2), Sapporo Medical College
(Chief: Prof. T. Onoe)

The butyrylcholinesterase (B-Ch E) activity of the rat hepatoma induced by 3'-methyl-4-dimethylaminoazobenzene (3'-Me-DAB) was studied histochemically by the method of Karnovsky and Roots.

In normal adult rats, any cells in the liver did not show the B-Ch E activity, while intestinal mucosal cells exhibited a prominent activity. In the hepatomas induced by 3'-Me-DAB, some hepatoma cells showed intense activity of B-Ch E. On the other hand, noncancerous portions of the liver did not show any positive reaction. The B-Ch E activity was most intensely seen in the hepatomas with an anaplastic pattern, especially in the areas where small hepatoma cells proliferated in a sheet-like pattern. On the other hand, well-differentiated hepatomas and hepatomas with an adenomatous pattern were barely stainable. By electron microscopy, the reaction products were found to be well localized in the cisternae of endoplasmic reticulum and nuclear envelopes.

It was suggested that B-Ch E might be an adequate marker of hepatoma like alpha-fetoprotein.

(Received November 22, 1977 and accepted December 12, 1977)

緒 言

がんが病理組織学的に様々の組織像を呈することは良く知られているが¹⁾, このような組織像の差が, がん細胞の生物学的な性状の差によるものであるかどうかは^{2,3)}, 興味のある問題であろう. 我々の教室で研究されている 3'-methyl-4-dimethylaminoazobenzene (3'-Me-DAB) によるラット肝癌では, 出来上った腫瘍がヒトの肝癌と同様に, 組織学的, 超微構造的に様々なパターンに分類される^{4~11)}. 3'-Me-DAB 肝癌の形態学的な分化度は, 組織学的, 超微構造的に検索されているが, 一般に, がんの機能的な分化の偏倚は母組織に固有の酵素の活性低下や, アイソザイムの臓器固有のパターンからの逸脱の程度により, かなり推察することができる^{12~18)}. 肝細胞のマーカー酵素とされている glucose-6-phosphatase (G-6-Pase) は多くの肝癌で低下することが知られており, しかも未分化に

なるにつれてその活性を失う^{15,19)}. しかし, この酵素は単なる細胞傷害によっても容易にその活性を失うことも知られており²⁰⁾, また, この酵素のアイソザイムも未だ発見されていないので, 分化度を知るマーカーとはなりにくい.

一方, この G-6-Pase と同じく, ラット肝細胞の小胞体にその活性の大部分が存在するとされている非特異的エステラーゼ^{16~18,21)} は, Kaneko ら^{16~18)} によって, セルロースアセテート膜上での電気泳動により, 約5本のアイソザイムに分けられることが明らかにされた. また, そのアイソザイムパターンは, 3'-Me-DAB 肝癌形成過程において, 癌化に伴い幼児型, 更に胎児型へと偏倚する. 興味あることには特に, 胎児型にみとめられる最も陰極側に泳動されるエステラーゼが butyrylcholinesterase (B-Ch E) 活性を有していることである. この B-Ch E は正常成熟ラットでは小腸粘膜に強い活性をみとめるが, 肝ではほとんど活性をみとめない. また, 再生肝においてもほとんど活性

をみとめず、胎児肝に軽度のみとめられるだけであるが、3'-Me-DAB 肝癌組織では強い活性がみとめられるという。

B-Ch E 活性が肝癌に出現することは他の研究者達^{22,23)}によっても報告されているが、組織化学的証明における B-Ch E 活性の特異性には問題があり、また、この B-Ch E 活性とアゾ色素肝癌の組織型との関連性については詳細な研究がない。そこで著者は、B-Ch E の組織化学的特異性を入念に吟味して至適の条件をみつけ出し、その条件のもとで 3'-Me-DAB によって形成された個々の肝癌を 1 ケずつ取り出し、その連続切片を作製して、組織型とその B-Ch E の組織化学とを正確に対比することによって 3'-Me-DAB 肝癌の組織像と B-Ch E 活性との関係を探索し、肝癌の分化度と B-Ch E 活性の意義について検討した。

材料および方法

動物は体重約 200 g の Wistar 系雄ラットを用い、基礎飼料 (オリエンタル酵母 K.K., 東京) に 3'-Me-DAB を 0.06% の割合に混じたものを 16 週間から 22 週間、水と共に連続的に自由に与え、肝癌を形成した 20 匹のラットの 32 個の肝癌組織を検索した。対照としては同系雄正常成熟ラットの肝と小腸、および胎生 18 日目のラット胎児肝を使用した。

光顕的検索：動物は断頭し、脱血後、直ちに肝を取り出し、厚さ約 4 mm のスライスを作製し、周囲の非癌部を含む腫瘍をトリミングし、すばやくこれをドライアイス・アセトンで -70°C にした n-ヘキサン中で凍結した。また一部は 10% 冷ホルマリンまたは冷カルノア液で固定後、パラフィン切片を作製し、ヘマトキシリン・エオシン (H・E) 染色して組織学的に観察した。

組織化学的検索：-20°C のクリオスタット中で同一の凍結ブロックにつき 3 枚ずつ、10 μ の連続切片を作製し、スライドグラスにはりつけ、直ちに乾燥したものを用いた。

B-Ch E 活性の検出には 1 枚目の切片を固定することなしに Karnovsky と Roots²⁴⁾ による浸漬液 (butyrylthiocholine iodide 15 mg, 0.1 M phosphate buffer (pH 6.0) 19.5 ml, 0.1 M sodium citrate 1.5 ml, 30 mM CuSO₄ 3 ml, dist. water 3 ml, 5 mM potassium ferricyanide 3 ml) 中で 37°C で浸漬した。

結果の項で述べるような B-Ch E 組織化学的検索法の吟味によって、浸漬時間は 1 時間とするのが最も特異的な条件と考えられたので、本実験ではすべてこの条件で行った。浸漬後、切片を蒸留水で洗い、10% ホルマリンで 15 分間後固定を行い、洗浄後、グリセリンゼラチンで封入し、光学顕微鏡で観察した。2 枚目の切片は 10% ホルマリン固定後、H・E 染色を行い、3 枚目の切片は Wachstein と

Meisel²⁵⁾ の方法により G-6-Pase 活性を検出し、これらと B-Ch E 活性部位とを比較検討した。

電顕的検索：動物はエーテル麻酔下で直ちに開腹し、まず門脈より約 30 ml/min の速さにて 1.25% グルタルアルデヒド (0.1 M カコジル酸緩衝液, pH 7.4) 溶液で約 1 分間溜流固定^{26,27)}を行い、直ちに 7.5% しょ糖を含んだ 0~4°C の 0.1 M カコジル酸緩衝液 (pH 7.4) を溜流することにより洗った後、肝を取り出し約 1 mm の厚さのスライスを作製し、前述の固定液で 0~4°C にて約 10 分間再固定を行った。よく固定された肝癌部をトリミングし、これを前述の 0~4°C の緩衝液に漬け、約 1~2 時間洗った後、Vibratome (Oxford 社製) で電顕用として約 40 μ の切片および光顕用として 15~20 μ の切片を作製した。各々の切片は前述の Karnovsky と Roots らによる浸漬液に 15% のしょ糖を含んだ反応液に 1 時間浸漬した後、上述の緩衝液で洗い、20 μ 切片は光顕的に観察し、電顕用は、実体顕微鏡下で陽性を示す部分を選びだして 1% OsO₄ にて後固定を行い、型のごとくエチルアルコールで脱水後、Luft²⁸⁾ に従って Epon 812 に包埋を行い、LKB ultratome にて切片を作製し、クエン酸鉛で単染色後、JEM 100C 電子顕微鏡で観察撮影を行った。

結 果

1) B-Ch E 組織化学的検索法の吟味 (特に浸漬時間について)

B-Ch E 活性を Karnovsky と Roots ら²⁴⁾ の方法に準じて組織化学的に検索する際、まず浸漬時間について種々の検討を行った。すなわち、原法による 2 時間の浸漬では正常成熟ラットの小腸粘膜上皮は強く染色されたが、一部の結合繊も弱く非特異的に染色された。肝では、大部分は陰性であるが一部の肝細胞の細胞質がわずかに染色され、また、核染および結合繊の弱染など非特異的な反応をみとめた。2 時間以上浸漬を行うと時間に比例して、これらの非特異的な反応が増強した。これに対して、1 時間の浸漬では小腸粘膜上皮においてのみ充分に強く染色され (photo. 1 A)、肝では正常肝細胞および非実質細胞はほとんど反応産物をみとめず、非特異的な反応もみとめなかった (photo. 4)。胎仔肝では小数の肝細胞に不規則な分布でわずかに活性をみとめた。

また、生化学的検索のためにセルロースアセテート膜上で組織ホジネートを展開したものを同上の浸漬液で染色すると、1 時間の浸漬では小腸粘膜上皮で出現する最も陰極側のバンドのみが特異的に強く染色されるのに対して、2 時間以上の浸漬では、正常肝細胞に存在する非特異的エステラーゼのバンドおよび非実質細胞に存在する非特異的

エステラーゼのバンドも染色されてくる¹⁸⁾。

これらの結果から、2時間以上浸漬を行うと、核染および拡散などの非特異的反応や B-Ch E 以外の非特異的エステラーゼによる反応が生ずることが示された。また、基質を含まない浸漬液および阻害剤として 10^{-4} M のエゼリンを含んだ浸漬液でそれぞれ、1時間浸漬を行った対照実験では、いずれも陰性であった (photo. 1 B)。更に、電顕的に活性の保存も充分で、その局在性もよく保たれており、浸漬時間を1時間とする本法の特異性が確められた。

2) 光顕的所見

3'-Me-DAB 飼育 16 週以後 22 週までに形成された肝癌は、組織学的に Stewart と Snel²⁹⁾ の分類に従うと次の4つの型に大別することができる。

- ① 索状癌型 (trabecular carcinomatous pattern)
- ② 腺癌型 (adenocarcinomatous pattern)
- ③ 低分化癌型 (anaplastic carcinomatous pattern)
- ④ 肉腫型 (sarcomatous pattern)

しかし、これらの組織学的な pattern は1個の癌結節組織内で複雑に混り合って存在することが多く、索状癌型と腺癌型が共存し、両者の間に低分化癌型を示す部分が介在してみられることがしばしばあり、特に腺癌型と低分化癌型とが混在する形が多くみられた (photo. 7 A)。

この低分化癌型では癌細胞は比較的小型で充実性胞巣を形成し、細胞学的には細胞境界は不明瞭でシート状に配列して増殖しており、核/細胞質比が大きく、細胞質は強い好塩基性を示し、核は円形で明瞭な核小体を数個みとめ、核分裂像もしばしばみとめられた。また、この低分化癌型を呈する部分にはしばしば髄外造血巣がみとめられた (photo. 2)。

組織化学的に B-Ch E 活性は、周囲の非癌組織にはほとんどみとめられず、肝癌部のみに強い活性をみとめた (photo. 3, 4 A, 4 B)。特に低分化癌型を示す部分では、検索したすべての例が陽性で、充実性胞巣を形成し、シート状に増殖する癌細胞の細胞質に赤褐色の反応産物をびまん性あるいは微細顆粒状にみとめ、強い活性が示された (photo. 5 A, 5 B)。一方、多くはこの充実性胞巣部と連続してみられる腺癌型では、一部に軽度の活性をみとめたが、大部分は陰性であった (photo. 7 A, 7 B, 8 A, 8 B)。しかし、充実性胞巣部を混じない腺癌型においては、一部比較強い活性をみとめるものもあった。索状癌型を示す部分は Edwards と White³⁰⁾ によると Hepatoma type I と type II に分けられているが、厚い細胞索を示す type I の部分ではほとんど活性を示さなかったが (photo. 9 A, 9 B)、薄い細胞索を示す type II の部分では B-Ch E を示した (photo. 10 A, 10 B)。

この B-Ch E 活性の分布とは反対に、連続切片での G-6-Pase 活性は増生結節を除く周囲の非癌組織に強い活性を示したが、肝癌部ではほとんど陰性であった (photo. 3, 4 A)。

3) 電顕的所見

Vibratome 切片で光顕的に強い B-Ch E 活性が証明された (photo. 4 B, 5 A, 5 B) 低分化癌型を示す癌組織を材料として用いた。

癌細胞は比較的小型の多角形細胞で不規則な配列を示し、腫瘍細胞同志は一般に比較的密に接触している (photo. 11~12)。まれに比較的広い細胞間隙をみとめる場合には間隙に向って microvilli を形成し、また、不完全ながら拡張した bile canaliculus を思わせる構造を形成していることもある (photo. 12)。核は細胞質に比して大型で、明瞭な核小体を持ち、核縁は不規則である、細胞質は小器官には比較的富んでおり、ミトコンドリアは比較的大型のものが多く、不規則な形をとるものが多い。小胞体は粗面小胞体 (r-ER) が比較的多いが、内腔の拡張、空胞化が著しい。滑面小胞体 (s-ER) は少なく、また、検索した範囲ではペルオキシゾームはみとめられなかった (photo. 13, 15)。

B-Ch E 活性は小胞体槽に局在しており、拡張、空胞化などを示さない r-ER、核膜槽に強い活性をみとめた。また、一部、細胞膜面にも活性をみとめた (photo. 13, 15)。

考 察

B-Ch E 活性の組織化学的検出において、結果に示したように浸漬時間を Karnovsky と Roots ら²⁴⁾ の原法より短縮することにより、特異的な条件を得た。Karnovsky と Roots ら²⁴⁾ によると浸漬液の pH を変化させたり、液の組成を変えると拡散や核染などの非特異的反応を生じると述べている。彼らは浸漬時間と非特異的反応の関係は述べていないが、一般に酵素組織化学においては浸漬時間は短いほどよく、特に1時間を越えない方が原則として特異性の点から好ましいとされている³¹⁾。我々が長時間浸漬することによって生じた非特異的な反応は、時間と共に液の pH や液成分の濃度が変動することによって生じたものと考えられる。また、正常肝細胞質の反応は生化学的検索から、正常肝細胞の細胞質に存在する非特異的エステラーゼによるものと考えられ、Goldfarb²³⁾ が行った overnight の浸漬はむしろ、特異性の点から問題があるとされよう。また、我々の条件では正常成熟ラットの小腸に充分強い活性をみとめ、肝ではほとんど活性をみとめなかったが、このことは Holmes と Masters²¹⁾ および Kaneko ら^{16~18)} の生化学的検索に完全に一致するものである。

3'-Me-DAB の経口的な連続投与によってラットに非常

に多彩な肝癌が形成されることが知られている^{2~4,7~11)}。これらの肝癌は Stewart と Snell²⁹⁾ によると四つの型に大別されるが、1 個の癌結節の中にこれら四つの組織型が複雑に組み合わせられ、混り合っていることが特徴的であるとされている。我々の実験においても同様の結果を得た。更に特徴的なことには、各々の癌結節の中に anaplastic carcinomatous pattern に当る充実性胞巣を示す部分が含まれることが程度の差はあれ、非常に多かった。しかもこの部分にはしばしば胎児肝にみられるような髄外造血がみとめられることが注目された。

B-Ch E 活性は組織化学的に肝癌部の癌細胞にのみ陽性であり、周囲の非癌部組織は陰性であった。このことは B-Ch E が hepatoma-associated-enzyme であることを示すものであり、B-Ch E 活性は肝癌のマーカーとなりうるものと推察された。しかも、Kaneko ら^{16~18)} によると再生肝ではこの酵素活性の上昇をみとめないで、B-Ch E 活性は単に増殖性の反映とはみなし得ない。

肝癌の組織型と B-Ch E 活性の関連性をみると、組織学的に anaplastic carcinomatous pattern を示し、小型の癌細胞がシート状に密に配列している充実性胞巣部ではすべて B-Ch E 活性が陽性であり、この部位に最も強い活性が証明された。一方、adenocarcinomatous pattern を示す部分では一部に陽性を示すものもあるが大部分は陰性であった。また、trabecular carcinomatous pattern を示す部分では高分化型とされている Hepatoma type I³⁰⁾ ではほとんどが陰性であり、より未分化とされている type II では陽性であった。

Kaneko ら^{16~18)} によると、生化学的にも diethylnitrosamine (DNE) 投与によって形成された分化型索状肝癌では B-Ch E 活性は軽度にしき出現しないが、3'-Me-DAB 肝癌では高い活性を示すと述べられており、また腹水肝癌 AH 130 のように著しく脱分化した肝癌細胞には B-Ch E 活性はみとめられない。このことから、B-Ch E 活性の組織化学的な所見は肝癌の分化度と密接な関連性があることが示唆される。すなわち、B-Ch E 活性は分化度の高い肝癌や脱分化の程度が強い肝癌ではみとめられないものと推察される。

また、興味あることには、組織化学的に B-Ch E 活性を強く示す肝癌組織において α -フェトプロテイン (AFP) が蛍光抗体法で陽性になる (千坂・横山ら、未発表) ことから、B-Ch E 活性を示す肝癌は AFP などの胎児性蛋白を産生する肝癌と同程度の分化度を示すものと考えられる。3'-Me-DAB 肝癌形成過程における肝の B-Ch E 活性の変動をみると、B-Ch E 活性は血中 AFP の変動と平行関係にあり 2 峰性を示す (横山・金子ら、未発表)。

一方、胎児肝に活性をみとめることから、B-Ch E 活性は肝エステラーゼの胎仔型とも考えられるが、癌胎児蛋白とされている AFP は胎仔肝で高度に産生されるのに対して、B-Ch E は軽度の活性しかみられず、肝癌の方がはるかにその活性が強い。肝癌に AFP 産生をみることは癌細胞の脱分化による胎児肝へのあともどり現象と考えられるので、AFP を癌胎児蛋白とすることに問題はないが、B-Ch E 活性は胎児肝よりも肝癌に特に強くみられることは、他の解釈が必要と考えられる。ここで注目されるのは小腸粘膜上皮細胞が強い B-Ch E 活性を示すことであろう。すなわち、B-Ch E 活性が肝癌に出現する意義は発生学的に肝臓の原基と同じく、前腸から発生する小腸粘膜上皮に強い活性をみることで、癌化に伴う disdifferentiation によって肝癌が部分的に腸への分化を示しているものと解釈することができるかもしれない³²⁾。

以上のことより、B-Ch E は肝癌関連酵素 (hepatoma-associated-enzyme) であり、3'-Me-DAB 肝癌形成過程において AFP と並んで肝癌の有力な positive marker となりうること、および肝癌の分化度を推察する手がかりとなりうるということが明らかにされたが、この B-Ch E が癌細胞内においてどのような代謝的役割を演じているかは未だ明らかではなく、今後解明されるべき重要な課題と考えられる。

要 約

ラットの 3'-Me-DAB 肝癌組織における B-Ch E 活性を組織化学的に検索し、腫瘍の分化度と本酵素の出現との関係を追求めた。組織化学の方法は Karnovsky と Roots に準じて行った。対照とした正常成熟ラットでは小腸の粘膜上皮に強い活性を認めたが、肝では実質、非実質細胞共にほとんど活性を認めなかった。肝癌組織では腫瘍部の癌細胞の細胞質にのみ強い活性を認められた。周囲非癌部では活性を認めなかった。こうした傾向は G-6-Pase 活性の分布とは逆であった。組織化学的活性の強さと肝癌の組織型との関連をみると、低分化肝癌に最も強く、特にシート状増殖を示す部分で強い活性をみとめた。しかし、索状配列を示す分化型肝癌や腺癌型を呈する部分では弱く、大部分は活性をみとめなかった。超微構造的には癌細胞の小胞体および核膜槽に B-Ch E 活性の局在を証明した。以上より、B-Ch E は AFP と並んで肝癌の指標となり得ることが示され、同時にその分化度の指標の 1 つとして有用と考えられた。

(本文の要旨は第 33 回、第 34 回日本癌学会総会において発表した。また、本研究の一部は文部省科学研究費の助成をうけて行った。)

文 献

- 1) 小野江為則: がんとかん細胞. 細胞 7, 437-446 (1975).
- 2) 小野江為則: 癌細胞超微構造の多彩性とその生物学的意義. 癌の臨床 12, 414-426 (1966).
- 3) 小野江為則, 布施裕輔, 森 道夫: 癌細胞の超微構造. 札幌医誌 34, 169-180 (1968).
- 4) 小野江為則: 化学物質による発癌過程の超微構造的追求. 第16回日医総会学術講演集 3, 48-55 (1963).
- 5) 小野江為則: 発癌の超微構造的な研究. 第12回日医総会学術講演集 2, 677-681 (1967).
- 6) 小野江為則: 癌の成因—特にアゾ色素肝癌をめぐる—. 日本医事新報ジュニア版 37, 3-7 (1967).
- 7) 布施裕輔, 稲岡行雄, 小野江為則: 癌細胞脱分化の超微構造的表現. 医学のあゆみ 69, 580-584 (1969).
- 8) 小野江為則, 布施裕輔: アゾ色素肝癌の発生. 細胞 2, 25-34 (1970).
- 9) Fuse, Y., Motoya, M., Iwasaki, T., Demop, K. and Onoe, T.: Liver tumors induced in rats by 3'-methyl-4-dimethyl-aminoazobenzen. I. Histological investigation. Tumor Res. 3, 113-143 (1968).
- 10) Fuse, Y., Iwasaki, T. and Onoe, T.: Liver tumors induced in rats by 3'-methyl-4-dimethyl-aminoazobenzene. II. Electron microscopic investigation—Dedifferentiation of cancer cells—. Tumor Res. 3, 145-185 (1968).
- 11) Fuse, Y., Iwasaki, T. and Onoe, T.: Liver tumors induced in rats by 3'-methyl-4-dimethyl-aminoazobenzene. III. Electron microscopic investigation—Disdifferentiation of cancer cells—. Tumor Res. 4, 1-28 (1969).
- 12) Criss, W. E.: A review of isozymes in cancer. Cancer Res. 31, 1523-1542 (1971).
- 13) Potter, V. R., Walker, P. R. and Goodman, J. I.: Survey of current studies on oncogeny as blocked ontogeny: Isozyme changes in livers of rat fed 3'-methyl-4-dimethylaminoazobenzene with collateral studies on DNA stability. Gann Monogr. Cancer Res. 13, 121-134 (1972).
- 14) Sugimura, T., Matsushima, T., Kawachi, T., Kogre, K., Tanaka, N., Miyake, S., Hozumi, M., Sato, S. and Sato, H.: Disdifferentiation and decarcinogenesis—the isozyme patterns in malignant tumors and membrane changes of cultured tumor cells. Gann Monogr. Cancer Res. 13, 31-46 (1972).
- 15) Kaneko, A., Dempo, K., Iwasaki, T. and Onoe, T.: Changes in the activities of glucose-6-phosphatase, aldolase, and alkaline phosphatase during azo-dye carcinogenesis. Gann 63, 31-39 (1972).
- 16) Kaneko, A., Dempo, K. and Onoe, T.: Heterogeneity of esterase and cell types in rat liver. Biochem. Biophys. Acta 284, 128-135 (1972).
- 17) Kaneko, A., Dempo, K., Yoshida, Y., Chisaka, N. and Onoe, T.: Deviation in esterase isozyme pattern during early stage of hepatocarcinogenesis by 3'-methyl-4-dimethylaminoazobenzene. Cancer Res. 34, 1816-1821 (1974).
- 18) Kaneko, A., Yoshida, Y., Yokoyama, S., Dempo, K. and Onoe, T.: Some properties and electrophoretic patterns of rat liver esterases in relation to hepatocarcinogenesis by 3'-methyl-4-dimethyl-aminoazobenzene. Gann 67, 331-337 (1976).
- 19) Weber, G. and Cantero, A.: Glucose-6-phosphatase activity in normal, precancerous and neoplastic tissues. Cancer Res. 15, 105-108 (1955).
- 20) Clifford, J. and Rees, K. R.: Biochemical changes in the endoplasmic reticulum in liver injury. J. Path. Bact. 91, 215-222 (1966).
- 21) Holmes, R. S. and Masters, C. J.: The developmental multiplicity and isoenzyme status of rat esterases. Biochim. Biophys. Acta 146, 138-150 (1967).
- 22) Sato, T.: Cholinesterase and blood serum from rats during development of hepatomas by carcinogen feeding. Gann 47, 237-242 (1956).
- 23) Goldfarb, S.: A morphological and histochemical study of carcinogenesis of the liver in rats fed 3'-methyl-4-dimethylaminoazobene. Cancer Res. 33, 1119-1128 (1973).
- 24) Karnovsky, M. J. and Roots, L.: A "direct-coloring" thiocholine method for cholinesterase. J. Histochem. Cytochem. 12, 219-221 (1964).
- 25) Wachstein, M. and Meisel, E.: On the histochemical demonstration of glucose-6-phosphatase. J. Histochem. Cytochem. 4, 592 (1962).
- 26) 横山繁昭, 小川勝洋, 水無瀬昂, 小野江為則: 肝灌流固定の電顕的酵素化学への応用. 北海道医誌 49, 160-161 (1974).
- 27) 水無瀬昂, 小川勝洋, 横山繁昭: 3'-Methyl-4-Dimethylaminoazobenzene および Alpha-Naphthyl-Isothiocyanate 投与ラット肝に増生する "Oval Cell" の組織化学的および電顕的組織化学的研究. 札幌医誌 44, 164-183 (1975).
- 28) Luft, J. H.: Improvements in epoxy resin embedding methods. J. Biophys. Biochem. Cytol. 9, 409-414 (1961).

- 29) Stewart, H. L. and Snell, K. C.: The histopathology of experimental tumors of the liver of the rat. A critical review of the histopathogenesis. In: F. Homburger (ed.), *Physiopathology of cancer*. 85-126, Harper & Row Publishes, New York (1959).
- 30) Edwards, J. E. and White, J.: Pathologic changes, with special reference to pigmentation and classification of hepatic tumors in rats fed p-dimethylaminoazobenzene (butteryellow). *J. Natl. Cancer Inst.* **2**, 157-183 (1941).
- 31) 小川和朗: 電子顕微鏡的細胞化学. 武内忠男, 清水信夫, 小川和朗編集: 酵素組織化学 437, 朝倉書店, 東京 (1967).
- 32) 小野江為則, 森 道夫: 肝臓の発達生物学. 小児科診療 **36**, 799-805 (1973).

Explanation of Photographs

- Photo. 1** The intestinal mucosa of normal adult rat. $\times 500$.
A: B-Ch E activity.
B: B-Ch E activity, incubated in the medium containing 10^{-4} M eserine.
- Photo. 2** 3'-Me-DAB hepatoma (anaplastic carcinomatous pattern). $\times 250$.
Extramedullary hematopoietic foci are seen in the hepatoma nodule.
- Photo. 3** 3'-Me-DAB hepatoma and normal liver. $\times 100$.
left: G-6-Pase activity is shown in the normal liver but not in the hepatoma.
right: B-Ch E activity is shown in the hepatoma but not in the normal liver.
- Photo. 4** 3'-Me-DAB hepatoma (Vibratome section). $\times 100$.
A: G-6-Pase activity.
B: B-Ch E activity.
- Photo. 5** 3'-Me-DAB hepatoma (Vibratome section).
A: B-Ch E activity. $\times 250$.
B: High-power view of the same specimen. $\times 500$.
- Photo. 6** 3'-Me-DAB hepatoma (anaplastic carcinomatous pattern). $\times 250$.
A: H. & E.
B: B-Ch E activity.
- Photo. 7** 3'-Me-DAB hepatoma (mixed with anaplastic carcinomatous pattern and adenocarcinomatous pattern). $\times 250$.
A: H. & E.
B: B-Ch E activity.
- Photo. 8** 3'-Me-DAB hepatoma (adenocarcinomatous pattern). $\times 250$.
A: H. & E.
B: B-Ch E activity.
- Photo. 9** 3'-Me-DAB hepatoma (trabecular carcinomatous pattern; highly-differentiated type). $\times 250$.
A: H. & E.
B: B-Ch E activity.
- Photo. 10** 3'-Me-DAB hepatoma (trabecular carcinomatous pattern; poorly-differentiated type). $\times 250$.
A: H. & E.
B: B-Ch E activity.
- Photo. 11-15** Electron micrographs of B-Ch E cytochemistry in 3'-Me-DAB hepatomas.

- Photo. 11** Small tumor cells are arranged in a sheet-form. $\times 2,000$.
- Photo. 12** The B-Ch E positive tumor cells form a structure like bile canaliculus. $\times 2,600$.
- Photo. 13** A high-power view of B-Ch E positive cell. $\times 10,000$
- Photo. 14** The cholangiolar tumor cells showing no B-Ch E reaction. $\times 10,000$.
- Photo. 15** Electron-opaque reaction products are distributed in the rough ER and on the plasma membrane. $\times 10,000$.









